

主 論 文

TRPC3 participates in angiotensin II type 1 receptor-dependent stress-induced slow increase in intracellular Ca^{2+} concentration in mouse cardiomyocytes
(マウス心筋細胞におけるアンジオテンシン II 1型受容体依存性伸展誘発遅発性細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に TRPC3 が関与している)

【緒言】

心臓における機械的負荷環境は、身体の生理的な需要に応じて心拍出量を調整するため、細胞内カルシウムハンドリングを介して収縮力に影響を与えている。心筋に数分間にわたる持続伸展刺激を加えると、フランク・スターリングの心臓の法則に続いて、伸展誘発遅発性細胞内カルシウム濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 増加 (stress-induced slow increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$: SSC) による収縮力増加が観察される。この SSC に伴う収縮力の緩徐な増加は、急激な後負荷増加に対応するための心臓の自律調節機構であり、臓器レベルでは Anrep 効果と呼ばれる生理現象として知られている。これまで、SSC に関わる様々なシグナル伝達経路が報告されているが、発生機序は未だ不明な点が多い。これまでに Transient receptor potential canonical (TRPC) チャネルの一種である TRPC3 と TRPC6 が SSC に関与する伸展誘発性非選択性陽イオンチャネル分子候補ではないかと推測されていた。これらのチャネルは、G タンパク共役型受容体 (GqPCR) であるアンジオテンシン II (AngII) 1型 (AT1) 受容体の活性化によりホスホリパーゼ C (PLC) を介して産生されたジアシルグリセロール (DAG) により活性が制御されている受容体作動性チャネルとして知られる。2014 年に TRPC6 が SSC に関与することが報告されたが、TRPC3 の関与は未解明である。このように SSC における TRPC チャネル研究を複雑にする要因の一つとしては、このチャネルの細胞内局在が未解明であることが挙げられる。すでにいくつかの報告はあるが、TRPC チャネルが心筋形質膜上に存在するか、筋小胞体 (SR) 膜上に存在するかは未だ見解の一致が得られていない。

本研究では、SSC における TRPC3 の役割を明かにするため、マウス心筋細胞を使用し AT1 受容体によって制御された TRPC3 が SSC に関与するかを検討した。また、TRPC チャネルの局在と SSC におけるこのチャネルの局在依存性の役割について、形質膜又は SR 膜上に TRPC チャネルを組み込んだ数値心筋細胞モデルを用いたコンピュータシミュレーションと免疫染色法を用いて検討した。

【材料と方法】

心筋細胞の単離

8–15 週齢の野生型 (C57BL/6J 及び 129/Sv) マウス、TRPC3 ノックアウト (*Trpc3*^{-/-}) マウス、TRPC6 ノックアウト (*Trpc6*^{-/-}) マウスの心臓から Langendorff 灌流装置を用いて酵素処理により心室筋細胞を単離した。単離した細胞は 1.8mM CaCl_2 を含んだ保存溶液に回収した。

[Ca²⁺]_i 測定

Fura-4F を負荷した心筋細胞を使用し IonOptix 社製カルシウムイメージング装置を用いて、[Ca²⁺]_i を測定した。測定には、340nm と 380nm の励起波長を用いて、480-520nm の蛍光波長を記録した。二波長の蛍光信号比 (340nm/380nm) から [Ca²⁺]_i の変化を測定した。

伸展及び AngII 負荷実験

カーボンファイバー (CF) を使用した伸展装置を用いて、Fura-4F を負荷した心筋細胞に伸展刺激を与えた。二本の CF にて細胞両端を固定後、normal Tyrode (NT) 溶液を室温で灌流し、1Hz の電気刺激下で初期状態の Fura-4F 蛍光信号比を記録した。その後、ピエゾモーターにより CF を動かし、サルコメア長で 8% の伸展刺激を細胞に負荷した。伸展は 300 秒以上持続させた。伸展 10 秒後と 300 秒後 (SSC) の Fura-4F 蛍光信号比を記録した。AngII 負荷実験では、伸展実験と同様の条件で伸展刺激の代わりに 1μM AngII を含んだ NT 溶液で灌流し、刺激を与えた。その後、AngII 灌流 10 秒後と 300 秒後の蛍光信号比を記録した。

数理心筋細胞モデル

数理心筋細胞モデルを使用し、持続伸展刺激による [Ca²⁺]_i の変化を形質膜上又は SR 膜上に TRPC3 が存在する場合で比較した。形質膜上の TRPC3 を介した電流は以下のように記述した。

$$I_{trpc} = I_{trpcNa} + I_{trpcK} + I_{trpcCa}$$

$$I_{trpcNa} = G_{trpcNa} (V - E_{Na})$$

$$I_{trpcK} = G_{trpcK} (V - E_K)$$

$$I_{trpcCa} = G_{trpcCa} (V - E_{Ca})$$

一方、SR 膜上の TRPC3 を介した Ca²⁺フラックスは、以下のように記述した。

$$J_{rel} = (K_{rel} F_{rel} + K_{leak} + K_{TRPC}) ([Ca^{2+}]_{SR} - [Ca^{2+}]_{iSL})$$

$G_{trpcNa} \cdot G_{trpcK} \cdot G_{trpcCa}$ 及び K_{TRPC} を変化させ、形質膜上もしくは SR 膜上の TRPC3 が活性化された状態を再現し、シミュレーションを実施した。

免疫組織染色

野生型 (129/Sv) 及び *Trpc3*^{-/-} マウスの心臓から組織切片を作成し、一次抗体として抗 TRPC3 抗体及び抗 Na/K-ATPase 抗体又は抗 SERCA2 抗体を用いて、各組織切片を二重染色した。

[結果]

AT1 受容体を介した TRPC3 の活性化は SSC 発生に関与している

伸展負荷装置を使用して、Fura-4F を負荷した心筋細胞 (C57BL/6J) に 300 秒間の伸展刺激を加えたところ、 $[Ca^{2+}]$ トランジェントは増大し、SSC を認めた。AngII を負荷した場合も SSC と同様の $[Ca^{2+}]$ トランジェントの増大が認められた。AT1 受容体阻害剤 (オルメサルタン) 及び、PLC 阻害剤 (U-73122)、TRPC 阻害剤 (BTP-2)、TRPC3 阻害剤 (Pyr3) を使用したところ、SSC の発生は抑制された。さらに、AngII 負荷により発生した $[Ca^{2+}]$ トランジェントの増大も U-73122、BTP-2 及び Pyr3 投与により抑制された。また、野生型 (129/Sv) マウス心筋細胞で認めた SSC は、*Trpc3*^{-/-} 及び *Trpc6*^{-/-} マウス心筋細胞では観察されなかった。よって、マウス心筋細胞の SSC 発生には AT1 受容体により活性制御された TRPC3 チャンネルが関与していることが示唆された。

心筋形質膜上に局在する TRPC3 が SSC 発生に関与している

心筋形質膜又は SR 膜上に TRPC3 チャンネルを模した伸展誘発性陽イオンチャンネルを組み込んだ数理心筋細胞モデルを使用し、TRPC3 チャンネルの細胞内局在を検討した。その結果、心筋形質膜上の TRPC3 チャンネルコンダクタンス (G_{trpcNa} 、 G_{trpcK} 、 G_{trpcCa}) を上昇させたときに SSC を認めた。一方、SR 膜上の TRPC3 を介した Ca^{2+} フラックス (K_{TRPC}) を上昇させても SSC は認めなかった。さらに、免疫組織染色法を用いて、TRPC3 の心筋細胞内局在を調べた。抗 TRPC3 抗体及び抗 Na/K-ATPase 抗体 (心筋形質膜マーカー) 又は抗 SERCA2 抗体 (SR 膜マーカー) を使用して、野生型 (129/Sv) マウス心筋組織を染色したところ、TRPC3 の約 17% が形質膜上に 45% が SR 膜上に存在していることを確認した。抗 TRPC3 抗体の特異性確認のため、*Trpc3*^{-/-} マウス心筋組織を同条件で染色すると TRPC3 シグナルは消失した。よって、心筋細胞数理モデル及び免疫組織染色法の結果から、心筋形質膜上に存在する TRPC3 画分が SSC 発生に関与していることが示唆された。

[考察]

我々は、TRPC3 を介した伸展誘発性陽イオン流入が SSC 発生に関与していることを証明した。2014 年に TRPC6 が SSC に関与するという報告があったため、本研究では TRPC6 とヘテロマルチマーを形成すると報告されている TRPC3 が SSC に関与するかを薬理的阻害及び遺伝子欠損マウス心筋細胞を用いることにより確かめた。その結果、TRPC6 だけでなく、TRPC3 も SSC に関与していることが示唆された。TRPC3 及び TRPC6 は AT1 受容体などの GqPCR によって活性制御される受容体作動性チャンネルとして機能する。本研究における伸展刺激及び AngII を負荷した $[Ca^{2+}]$ トランジェント測定実験の結果は、TRPC3 の活性化が AT1 受容体-Gq-PLC-DAG シグナル伝達経路を介して調節されていることを示している。しかし、AT1 受容体の活性化は NADPH オキシダーゼを介して活性酸素種を生成し、TRPC6 を制御することも報告されているため、このシグナル伝達経路については更なる検討が必要である。

我々の数理モデル実験では、ウェット実験で観察された SSC は細胞外からの陽イオン流入がある条件においてのみ再現できた。これは、TRPC3 が心筋形質膜上に存在していることを示唆している。しかし、先行研究では TRPC3 は形質膜だけでなく SR 膜上にも存在することが報告されている。そこで、免疫組織学的手法により TRPC3 の局在を確かめたところ、17% の TRPC3 が形質膜上に存在し、45% の TRPC3 は SR 膜上に存在することが示された。数理モデルと免疫染色法を組み合わせた結果からは、形質膜上に存在する TRPC3 画分を介した伸展誘発性陽イオン流入が SSC 発生に関与していることが強く示唆された。

【結論】

伸展刺激による AT1 受容体の活性化は、AT1 受容体－Gq－PLC－DAG シグナル伝達経路を介し、心筋形質膜上の TRPC3 を制御し、心筋細胞の SSC 発生に関与している。